

一种新的人兽共患传染病 —— 狐狸阴道加德纳氏菌病的研究*

VI. 阴道加德纳氏菌病灭活疫苗的研制

严忠诚 闫新华 闫喜军 栾凤英 王长凤

(中国农业科学院特产研究所 吉林 132109)

摘要 选用免疫原性优良的我国狐狸阴道加德纳氏菌主要流行型血清 I 型 GVF44 号菌株, 先后试验研制了氢氧化铝胶、蜂胶和油佐剂灭活苗。试验结果表明, 胶苗的安全性优, 免疫剂量为 40 亿菌 / 1ml, 3 倍免疫剂量的胶苗接种狐狸后无任何不良反应, 免疫后 21d 经 100 个 ID₅₀ 强毒的攻击, 对 I 型的保护率达 92%, 对 II、III 型的保护率达 80% 以上。免疫持续期为 6 个月, 4 ~ 10 ℃ 条件下可保存 10 个月。通过田间试验应用证实该疫苗安全、有效。

关键词 狐狸, 阴道加德纳氏菌, 灭活疫苗, 佐剂

通过病原菌分离鉴定与流行病学调查等证实^[1~3], 阴道加德纳氏菌 (*Gardnerella vaginalis*) 病在国内各养狐场已广泛流行, 导致大批狐、貉、水貂空怀与流产, 是当前危害上述经济动物繁殖最严重的传染病之一。为预防和有效控制该病流行, 在课题前期大量研究工作基础上^[1~7], 1990 ~ 1992 年进行了灭活疫苗的试验研制工作, 现报告如下。

1 材料和方法

1.1 菌种

1.1.1 制苗菌种: 选用免疫原性优良的血清 I 型代表株 GVF44 作为制苗菌种。

1.1.2 疫苗攻毒菌株: 选用强毒株 GVF44、GVF402、GVF458, 均由本研究室保存和提供。

1.2 培养基和培养方法

1.2.1 培养基: 5% 兔血胰朊琼脂平板和改良的胰朊汤, 同文献[1]。

1.2.2 培养方法: 启封冻干菌种, 用灭菌生理盐水适当稀释后, 接种 5% 兔血胰朊琼脂平板, 37 ℃ 培养 48h, 选取具有典型 β 溶血环的菌落 10 个, 再转种于 200ml 改良的

* 农业部畜牧业“八五”重点研究专题。

参加本研究工作的还有中国农业科学院特产研究所赵传芳; 中国兽药监察所吴福林、毛开荣、黄海波; 吉林省敦化市林业局养殖场尹迎春、王明臣、曲淑梅; 辽宁省金州水貂场张志明、张桂生、王孝胜。

本文于 1996 年 5 月 31 日收到。

胰朙汤瓶中培养24h，即为基本种子。将基本种子按1:20比例转种于20个200ml培养瓶中培养24h为种子液，经过种子纯检后，仍按1:20比例转种于10L瓶中培养48h收获，并计算菌数。

1.3 佐剂

1.3.1 20%的铝胶盐水稀释液：910251批，920557批，分别购于吉林省生物制品厂。

1.3.2 蜂胶：购自中国农业科学院蜜蜂研究所。

1.3.3 10号白油、司盘-85和吐温-85：均由农业科学院哈尔滨兽医研究所提供。

1.4 试剂

1.4.1 甲醛(分析纯)：吉林省通化市化学工业研究试验厂生产。

1.4.2 95%乙醇(分析纯)：吉林省军区化工厂产品。

1.5 仪器

89HW-1型恒温磁力搅拌器，浙江乐成电器厂产品。

1.6 灭活剂浓度和灭活时间的筛选

取1.2.2中培养的菌悬液8瓶，每瓶100ml。试验分为3组，每组2瓶，按组别依次加入36%甲醛溶液，使其最终浓度分别为0.05%、0.1%、0.2%，同对照组一起置于37℃作用并定时振荡，于作用后4、8、12、16、20和24h，每瓶定时取样分别接种于2个50ml胰朙汤瓶中进行培养观察至12d，测试最佳的灭活浓度与灭活时间。

1.7 不同佐剂灭活苗制备方法、免疫效果和最小免疫剂量的测定

1.7.1 无佐剂灭活苗：40亿/ml。

1.7.2 铝胶灭活苗：40亿/ml。

1.7.3 蜂胶灭活苗：40亿/ml。其制备方法参照沈志强等^[8]的报道。

1.7.4 油佐剂灭活苗：40亿/ml。水相：菌液96份，吐温-854份；油相：白油90份，司盘-8510份，均115℃30min高压蒸汽灭菌使用。按其1:1比例将水相缓慢的加入油相中，用恒温磁力搅拌器搅拌制成。

取上述四种灭活苗，其免疫剂量分别为30亿/ml、40亿/ml、50亿/ml免疫健康狐，免后30d采血测定抗体滴度，同时，用100个ID₅₀的GVF44号强毒进行攻击，攻毒后15d进行阴道分菌。

1.8 试验疫苗

9101、9102、9103、9201和9202批铝胶灭活苗，含菌量40亿/ml，均由本研究室研制。

1.9 血清抗体检测

采用DOT-ELISA检测方法。

1.10 实验动物

北极狐：体重4.0~5.0kg，日龄为5.5~6个月，选自吉林省某养殖场阴道分菌和血清学检验均呈阴性的健康皮兽狐。

1.11 安全试验

选试验狐27只，分成9组，每组3只，分别肌肉注射三种佐剂灭活苗，每种苗的各组剂量分别为1ml、2ml和3ml，接种后观察15d，记录不同佐剂灭活苗的临床反

应。

1.12 疫苗免疫效力试验

先后对研制的铝胶灭活苗 9101、9102、9103、9201 和 9202 批，利用本动物进行效力检测。选取血清学检验阴性的健康狐，分为试验与对照组，每只试验狐肌肉接种对应试验批号的疫苗 40 亿(1ml)，免疫后 21d 各批分别用 100 个 ID₅₀ 的 GVF44、GVF402、GVF458 强毒攻击，攻毒后 15d 进行阴道分离菌，记录保护情况。

1.13 免疫期试验

先后用 9101、9102、9103、9201 及 9202 批免疫苗检和血清学检验阴性的健康狐，每只剂量为 40 亿 / 1ml，免疫后 2、4、6、8、10 个月，每批苗用狐 5 只连同对照组同时用 100 个 ID₅₀ 的 GVF44 菌株进行攻击。阴道分离菌，测定免疫后不同时间的免疫效果。

1.14 疫苗保存期试验

先后对 9101、9102、9103、9201 和 9202 批铝胶灭活苗于 4 ~ 10 ℃ 冰箱保存后的 8、10 和 12 个月；25 ℃ 以下阴暗条件保存 4 个月进行测试。取出免疫健康狐，免疫后 20d 连同对照组用 100 个 ID₅₀ 的 GVF44 菌株进行攻击，阴道分菌计算保护率。

1.15 田间试验

先后用研制的 9101、9102、9103、9201 与 9202 批铝胶灭活疫苗，分别对吉林省敦化市某养殖场和辽宁省金州某水貂场血清学检验后的阴性种狐共 3100 只进行免疫接种，每只 40 亿 / 1ml。

1.15.1 疫苗安全性试验：每批疫苗均分别用 3 倍免疫剂量各接种狐狸 5 只，接种后观察 10d，记录临床反应。

1.15.2 疫苗免疫效力试验：免疫后 30d 从狐群中随机选出试验组连同对照组一起用 100 个 ID₅₀ 的 GVF44 进行强毒攻击，攻击后 15d 进行阴道分菌，计算免疫效果。

1.15.3 免疫持续期测定：于每批疫苗免疫后的 5、6 个月，连同对照组分别用强毒攻击，攻毒后 15d 进行阴道分离菌，计算保护情况。

1.15.4 疫苗保存期测定：先后将 9101、9102、9103、9201 和 9202 批灭活苗置于 4 ~ 10 ℃ 冰箱保存 10 个月，然后攻毒，计算保护结果。

2 结果

2.1 灭活剂浓度筛选

0.05% 甲醛灭活组于作用后的 4、8、12、16、20 和 24h 至第 5 天均出现阴道加德纳氏菌生长。而 0.1% 和 0.2% 甲醛两组于作用后 8h ~ 12d 均无任何细菌生长。上述试验重复两次结果一致。

2.2 不同佐剂灭活苗免疫效果和最小免疫剂量的试验

表 1 结果表明，无佐剂灭活苗的抗体水平和保护效果均劣，另三种佐剂灭活苗免疫效果差异不明显，不同剂量均可得到 3 / 3 保护，而 40 亿和 50 亿菌保护效果差异不明显。试验结果表明，40 亿菌(1ml)足以使狐狸获得较强的免疫力，最小免疫剂量为 30 亿菌，故免疫剂量定为 40 亿菌。

表 1 不同佐剂灭活苗免疫效果及最小免疫剂量测定结果

Table 1 The immune effect for different adjuvant inactivated vaccine and experimental results for minimal immune doses

试验组别 Experimental groups	批号 Lot number	免疫剂量 (亿) (A hundred million)	抗体滴度 (30d) Antibody titer	分菌结果 (只) Isolate results (single)	保护数 (只) Protect number (single)	保护率 Protect rate / (%)
无佐剂苗 No adjuvant inactivated vaccine		30 40 50	80 ~ 160 160 ~ 320 160 ~ 320	1 / 3 1 / 3 0 / 3	2 / 3 2 / 3 3 / 3	66.7 66.7 100
铝胶苗 Aluminum hydroxide gel inactivated vaccine	9202	30 40 50	320 ~ 640 2560 ~ 5120 2560 ~ 5120	0 / 3 0 / 3 0 / 3	3 / 3 3 / 3 3 / 3	100 100 100
蜂胶苗 Propolis inactivated vaccine	9202	30 40 50	640 ~ 1280 5120 5120	0 / 3 0 / 3 0 / 3	3 / 3 3 / 3 3 / 3	100 100 100
油佐剂苗 Oil adjuvant inactivated vaccine	9202	30 40 50	320 ~ 1260 5120 2560 ~ 5120	0 / 3 0 / 3 0 / 3	3 / 3 3 / 3 3 / 3	100 100 100
对照组 Control	GVF44	攻击 challenge	0	3 / 3	0 / 3	0

2.3 安全性试验

铝胶灭活苗接种后，狐体与局部均无任何异常反应，而蜂胶和油佐剂灭活苗注射后第二天即表现出精神沉郁，食欲减退等全身反应，个别狐狸注射局部出现炎性肿胀、脓肿和溃疡，仔狐接种股部肌肉往往压迫坐骨神经引起后肢麻痹而导致吃腿等严重不良反应，表明这两种佐剂苗对局部的刺激性和压迫性较强。

2.4 免疫效力试验

表 2 结果表明，用血清 I 型的 GVF44 菌株制成的疫苗对自身菌株攻击产生 100% 保护，而对血清 II 型、III 型代表株 GVF458、GVF402 产生 80% 以上的保护。

2.5 免疫持续期试验

由表 3 可以看出，本病灭活苗的免疫期可持续 8 个月，从第 6 个月开始抗体阳转率略有下降，但对强毒的保护作用还很强，为了保证该苗的免疫效果，确定其免疫期为 6 个月。

表 2 铝胶灭活苗对狐的免疫效力试验

Table 2 Immune force experiment of the aluminum hydroxide gel inactivated vaccine to fox

疫苗批号	试验组别	免疫剂量 (亿) Immune doses (A hundred million)	攻毒菌株	分离菌结果 (只) Isolate results (single)	保护数 (只) Protect number (single)	保护率 Protect rate / (%)
Vaccine lot number	Exper imental groups		Challenging strains			
9101	试验组		GVF44	0 / 6	6 / 6	100
	Exper imental groups	40	GVF402	1 / 6	5 / 6	83.3
			GVF458	1 / 6	5 / 6	83.3
			GVF44	3 / 3	0 / 3	0
	对照组		GVF402	3 / 3	0 / 3	0
	Control		GVF458	3 / 3	0 / 3	0
9102	试验组		GVF44	0 / 5	5 / 5	100
	Exper imental groups	40	GVF402	1 / 5	4 / 5	80
			GVF458	1 / 5	4 / 5	80
			GVF44	3 / 3	0 / 3	0
	对照组		GVF402	3 / 3	0 / 3	0
	Control		GVF458	3 / 3	0 / 3	0
9103	试验组		GVF44	0 / 6	6 / 6	100
	Exper imental groups	40	GVF402	1 / 6	5 / 6	83.3
			GVF458	1 / 6	5 / 6	83.3
			GVF44	3 / 3	0 / 3	0
	对照组		GVF402	3 / 3	0 / 3	0
	Control		GVF458	3 / 3	0 / 3	0
9201	试验组		GVF44	0 / 6	6 / 6	100
	Exper imental groups	40	GVF402	1 / 6	5 / 6	83.3
			GVF458	1 / 6	5 / 6	83.3
			GVF44	3 / 3	0 / 3	0
	对照组		GVF402	3 / 3	0 / 3	0
	Control		GVF458	3 / 3	0 / 3	0
9202	试验组		GVF44	0 / 6	6 / 6	100
	Exper imental groups	40	GVF402	1 / 6	5 / 6	83.3
			GVF458	1 / 6	5 / 6	83.3
			GVF44	3 / 3	0 / 3	0
	对照组		GVF402	3 / 3	0 / 3	0
	Control		GVF458	3 / 3	0 / 3	0

表3 免疫持续期试验

Table 3 Experimental result for immunity period

免疫时间 (月) Immune time (month)	批号 Lot number	组别 Group	抗体阳转率 The rate of converting antibody into positive / (%)		保护率 Protect rate / (%)
				/ (%)	
2	9101	免疫 Immune	100		100
		对照 Control	—		0
	9102	免疫 Immune	100		100
		对照 Control	—		0
	9103	免疫 Immune	100		100
		对照 Control	—		0
	9201	免疫 Immune	100		100
		对照 Control	—		0
	9202	免疫 Immune	100		100
		对照 Control	—		0
4	9101	免疫 Immune	100		100
		对照 Control	—		0
	9102	免疫 Immune	100		100
		对照 Control	—		0
	9103	免疫 Immune	100		100
		对照 Control	—		0
	9201	免疫 Immune	100		100
		对照 Control	—		0
	9202	免疫 Immune	100		100
		对照 Control	—		0
6	9101	免疫 Immune	80		80
		对照 Control	—		0
	9102	免疫 Immune	100		100
		对照 Control	—		0
	9103	免疫 Immune	100		100
		对照 Control	—		0
	9201	免疫 Immune	80		80
		对照 Control	—		0
	9202	免疫 Immune	100		100
		对照 Control	—		0

续表 3

免疫时间 (月) Immune time (month)	批号 Lot number	组别 Group	抗体阳转率 The rate of converting antibody into positive / (%)		保护率 Protect rate / (%)
8	9101	免疫 Immune	60		80
		对照 Control	—		0
	9102	免疫 Immune	80		100
		对照 Control	—		0
	9103	免疫 Immune	80		100
		对照 Control	—		0
	9201	免疫 Immune	60		80
		对照 Control	—		0
10	9202	免疫 Immune	100		80
		对照 Control	—		0
	9101	免疫 Immune	40		60
		对照 Control	—		0
	9102	免疫 Immune	80		80
		对照 Control	—		0
	9103	免疫 Immune	80		80
		对照 Control	—		0
9201	9202	免疫 Immune	60		60
		对照 Control	—		0
	9103	免疫 Immune	80		60
		对照 Control	—		0

2.6 疫苗保存期试验结果

将疫苗置于4~10℃冰箱中保存10个月，25℃以下阴暗条件保存4个月其物理性状稳定，肉眼观察无异常所见。检测疫苗效价及免疫狐血清抗体阳转情况并攻击强毒，结果见表4。

表4结果表明，阴道加德纳氏菌灭活疫苗于4~10℃冰箱保存10个月，25℃以下阴暗条件保存4个月，免疫狐狸结果，抗体的阳转率及强毒攻击的保护率同保存前对比，差距很小，其免疫效果和保存前类似或相同。说明该苗性能较为稳定。

2.7 灭活疫苗的田间试验

2.7.1 安全性试验：试验结果表明，用3倍剂量的各批疫苗接种动物，经临床观察全身与局部均无异常反应。

2.7.2 疫苗田间免疫效力试验：表5可以看出，进行田间试验的5批灭活苗其保护率平均为92%。

表4 灭活疫苗保存期试验结果

Table 4 Storage period experimental result for inactivated vaccine

保存月数 Storage months	保存条件 Storage condition	疫苗批号 Vaccine lot number	组 别 Group	抗体阳转率 The rate of converting antibody into positive / (%)	保护率 Protect rate / (%)
8	4~10℃	9101	保存前 B. Storage	100	100
			保存后 A. Storage	100	100
		9102	保存前 B. Storage	100	100
			保存后 A. Storage	100	100
		9103	保存前 B. Storage	100	100
			保存后 A. Storage	100	100
		9201	保存前 B. Storage	100	100
			保存后 A. Storage	100	100
		9202	保存前 B. Storage	100	100
			保存后 A. Storage	100	100
10	4~10℃	9101	保存前 B. Storage	100	100
			保存后 A. Storage	80	100
		9102	保存前 B. Storage	100	100
			保存后 A. Storage	100	100
		9103	保存前 B. Storage	100	100
			保存后 A. Storage	100	100
		9201	保存前 B. Storage	100	100
			保存后 A. Storage	80	80
		9202	保存前 B. Storage	100	100
			保存后 A. Storage	80	100
12	4~10℃	9101	保存前 B. Storage	100	100
			保存后 A. Storage	80	80
		9102	保存前 B. Storage	100	100
			保存后 A. Storage	80	80
		9103	保存前 B. Storage	100	100
			保存后 A. Storage	60	80
		9201	保存前 B. Storage	100	100
			保存后 A. Storage	60	60
		9202	保存前 B. Storage	100	100
			保存后 A. Storage	60	80
4	25℃以下 Below at 25℃	9101	保存前 B. Storage	100	100
			保存后 A. Storage	80	80
		9102	保存前 B. Storage	100	100
			保存后 A. Storage	100	100
		9103	保存前 B. Storage	100	100
			保存后 A. Storage	100	80
		9201	保存前 B. Storage	100	100
			保存后 A. Storage	80	80
		9202	保存前 B. Storage	100	100
			保存后 A. Storage	100	80

表 5 疫苗田间免疫效力试验

Table 5 Immune efficacy experimental in field for vaccine

批号 Lot number	免疫组 Immune group			对照组 Control group		
	抗体阳转数 (只) The number of converting antibody into positive (single)	阳转率 Positive rate / (%)	保护数 (只) Protect number (single)	保护率 Protect rate / (%)	保护数 (只) Protect number (single)	保护率 Protect rate / (%)
9101	5 / 5	100	5 / 5	100	0 / 5	0
9102	5 / 5	100	4 / 5	80	0 / 5	0
9103	5 / 5	100	5 / 5	100	0 / 5	0
9201	5 / 5	100	4 / 5	80	0 / 5	0
9202	5 / 5	100	5 / 5	100	0 / 5	0

表 6 疫苗田间免疫期测试

Table 6 Immune period experiment in field for vaccine

免疫时间(月) Immune time (month)	批号 Lot number	试验组别 Experimental group	抗体阳转率 The rate of converting antibody into positive / (%)	保护率 Protect rate / (%)
5	9101	免疫 Immune	100	100
		对照 Control	—	0
	9102	免疫 Immune	100	100
		对照 Control	—	0
	9103	免疫 Immune	100	100
		对照 Control	—	0
	9201	免疫 Immune	100	100
		对照 Control	—	0
	9202	免疫 Immune	100	100
		对照 Control	—	0
6	9101	免疫 Immune	80	100
		对照 Control	—	0
	9102	免疫 Immune	100	100
		对照 Control	—	0
	9103	免疫 Immune	80	100
		对照 Control	—	0
	9201	免疫 Immune	100	100
		对照 Control	—	0
9202		免疫 Immune	100	100
		对照 Control	—	0

2.7.3 疫苗田间免疫测试：表 6 结果表明，免疫后 5、6 个月进行攻毒，仍可获得 100% 的保护，从中证实了该苗的准确性。

表 7 疫苗田间试验保存期测试

Table 7 Storage period experiment in field for vaccine

保存时间 (月) Storage time (month)	保存条件 Storage condition	批号 Lot number	组别 Group	抗体阳转率 The rate of converting antibody into positive / (%)	保护率 Protect rate / (%)
10	4 ~ 10 °C	9101	保存前 B. Storage	100	100
			保存后 A. Storage	100	100
		9102	保存前 B. Storage	100	100
			保存后 A. Storage	100	80
		9103	保存前 B. Storage	100	100
			保存后 A. Storage	100	100
		9201	保存前 B. Storage	100	100
			保存后 A. Storage	100	100
		9202	保存前 B. Storage	100	100
			保存后 A. Storage	100	100

2.7.4 疫苗田间试验保存期测试：表 7 可见，本灭活苗于 4 ~ 10 °C 冰箱保存 10 个月，保护效果不减，证实了疫苗的稳定性。

3 结论和讨论

通过阴道加德纳氏菌灭疫苗的研制，筛选出甲醛制苗最适宜的灭活浓度，与菌液作用 8h 后即可完全灭活。同时，证实攻毒后 15d 进行阴道分菌是狐感染与非感染的可靠依据。

通过不同佐剂灭活疫苗免疫效果的对比，铝胶苗、蜂胶苗和油佐剂苗三者差异不大，从中筛选出铝胶苗的安全性对狐为优(特别是仔狐)，无任何不良反应，故作为今后定型产品。免疫剂量为 40 亿(1ml)。

以国内狐狸阴道加德纳氏菌主要流行型血清 I 型代表株 GVF44 制造疫苗对狐进行免疫后，其保护率平均为 92%，且对血清 II 型、III 型有 80% 以上的保护，从中表明，三个血清型间有着共同保护性抗原^[4]，可代替生产多价疫苗。另外，用 DOT-ELISA 检测免疫后血清抗体表明，血清抗体效价与免疫保护呈正相关。这为今后评价疫苗的免疫效果，提供了血清学基础。

通过实验室和田间免疫试验结果表明：该灭活苗的可靠性和稳定性较好，故确定疫苗的免疫期为 6 个月，4 ~ 10 °C 保存期为 10 个月。为此，进一步肯定了其应用价值，可批量生产进行区域试验与推广应用。

参 考 文 献

- [1] 严忠诚, 闫新华, 栾凤英, 等. 微生物学报, 1995, 35(1): 28 ~ 32.
- [2] 严忠诚, 闫新华, 栾凤英, 等. 微生物学报, 1995, 35(3): 209 ~ 215.
- [3] 蔡妙英, 卫军, 严忠诚, 等. 微生物学报, 1995, 35(1): 33 ~ 37.
- [4] 闫新华, 严忠诚, 闫喜军, 等. 微生物学报, 1995, 35(4): 287 ~ 291.
- [5] 闫新华, 严忠诚, 栾凤英, 等. 微生物学报, 1996, 36(5): 373 ~ 378.
- [6] 闫新华, 严忠诚, 栾凤英, 等. 特产研究, 1995, (2): 1 ~ 5.
- [7] 闫新华, 严忠诚, 栾凤英, 等. 特产研究, 1995, (4): 7 ~ 10.
- [8] 沈志强, 杨永福. 中国畜禽传染病, 1989, (5): 1 ~ 3.

STUDY ON THE INACTIVATED VACCINE OF *GARDNERELLA VAGINALIS* OF FOX

VI. EXPERIMENTAL DEVELOPMENT OF THE INACTIVATED VACCINE OF *GARDNERELLA VAGINALIS* OF FOX

Yan Zhongcheng Yan Xinhua Yan Xijun

Luan Fengying Wang Changfeng

(Speciality Institute of CAAS, Jilin 132109)

Abstract The aluminum hydroxide gel, propolis and oil adjuvant inactivated vaccines were developed by selecting good immunity, representing principal epidemic serotype I GVF44 of *Gardnerella vaginalis* of fox in civil. The results showed that the aluminum hydroxide gel vaccine in safety was better than propolis and oil adjuvant vaccines, the most optimal inactivated concentration of formalin is 0.1%. Efficient immunity doses are 4 billion bacteria /1ml. There were on any bad influences to occur for fox after the aluminum hydroxide gel of three times immunity doses were injected. The inoculated foxes could resist challenge of a hundred ID₅₀ virulent strains after the vaccine was injected to foxes for 21 d. Immunity period of the vaccine is 6 months. storage period is 10 months at 4 ~ 10 °C. The field experiments confirmed that the vaccine possessed accuracy, stability and reliability.

Key words Fox, *Gardnerella vaginalis*, Inactivated vaccine, Adjuvant